

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05989

研究課題名(和文) イネ科牧草におけるエンドファイトの垂直伝播を制御する遺伝子の同定

研究課題名(英文) Genetic analysis of vertical transmission of *Epichloe uncinata* endophyte in *Lolium multiflorum* Lam.

研究代表者

田村 健一 (Tamura, Ken-ichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：10414749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：共生糸状菌(エンドファイト)はイネ科牧草の耐虫性向上などに寄与するが、感染の安定性が育種上の問題となる。イタリアンライグラスと*Epichloe uncinata*共生系を対象に、菌の植物体から種子への移行に関わる宿主植物側の遺伝的要因の解明を試みたが、当初想定した遺伝的な分離は生じず、菌の安定的な種子への移行が認められた。次に菌の種子から幼苗への移行を*E. occultans*と比較した結果、高温や高湿処理により移行率が顕著に低下したことから、*E. uncinata*共生系における感染率低下の最も大きなリスクは種子の保管条件にあることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イタリアンライグラスと*Epichloe uncinata*共生系における菌の感染率低下が主に種子保管中に生じることを明らかにしたことで、エンドファイト感染品種の普及のためには、種子中の菌の安定性の高い品種の開発や種子の低温保存の重要性を明確化できた点に社会的意義がある。さらにエンドファイトの宿主特異性に関わりうる成果が得られた点には学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)： *Epichloe* endophyte (symbiotic fungi) contribute to the improvement of insect resistance of grass species, but the instability of endophyte in plants is a breeding problem. We attempted to elucidate the genetic factors in Italian ryegrass, as a host plant, involved in the transfer of the *Epichloe uncinata* from plants to seeds in the symbiotic system. However genetic separation on the transfer of endophyte did not occur as initially expected and the endophyte was stably transferred to the seeds. Next, the transfer of *E. uncinata* from seeds to young seedlings was compared with that of *E. occultans*, and the results showed that high temperature and/or high humidity treatments significantly reduced the transfer rate of *E. uncinata*, indicating that the greatest risk of reduced infection rate in the *E. uncinata* - Italian ryegrass symbiotic system is in the seed storage conditions.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ科牧草 イタリアンライグラス エンドファイト *Epichloe* 相利共生

1. 研究開始当初の背景

共生糸状菌(エンドファイト)はイネ科牧草の耐虫性向上などに寄与することから品種開発に利用されている。エンドファイトを利用した育種の問題点の一つは感染の安定性である。*Epichloë* エンドファイトの多くは無性生殖のみを行い、菌糸体が垂直伝播、すなわち種子感染することで、宿主の世代を越えて共生関係を維持する。エンドファイト感染率の低下リスクとして、種子の保管時の環境が原因となる死滅、種子から幼苗への移行の有無、そして植物体から種子への移行の有無が挙げられる。このうち、種子への移行率については、宿主植物の遺伝子型により変異があり、宿主側の遺伝的要因により感染率が変動することが示唆されていた。申請者らは、予備的な試験において一年生牧草イタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.) と *E. uncinata* 共生系における *E. uncinata* の種子への移行率に変異を有する集団を見出していた。

2. 研究の目的

イタリアンライグラスと *Epichloë* エンドファイトの共生系を対象に、以下を当初の目的とした。

1. エンドファイトの垂直伝播、すなわち宿主植物体から種子への移行を制御するイタリアンライグラスの遺伝的要因を明らかにする。
2. エンドファイトの種子への移行制御に関連する環境要因を明らかにする。また種子移行制御が生じる生育ステージや部位、およびそのメカニズムの詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 植物体から種子へのエンドファイト移行に関する研究

過去の交配実験から、感染した *E. uncinata* が全ての種子へ移行する顕性対立遺伝子を A、種子へ全く移行しない潜性対立遺伝子を a とする 1 遺伝子制御モデルを仮定した。イタリアンライグラス「JFIR18①」由来集団に由来する、感染済種子親 Aa と花粉親 aa 間の 7 組合せの単交配後代母系を実験材料とした。栽培環境条件は閉鎖系温室、ガラス温室および屋外圃場とした。幼苗時の茎葉部にエンドファイトが感染していることを確認した母系について上記条件で栽培・放任受粉後採種し、各個体の後代種子における感染の有無を検鏡により調査した。

(2) 種子から植物体へのエンドファイト移行に関する研究

イタリアンライグラス-*E. occultans* 共生系(自然界での共生系)とイタリアンライグラス-*E. uncinata* 共生系(人工接種による共生系)における、エンドファイトの種子から植物体への移行率を比較するために、*E. occultans* 感染個体(自然群集由来)と *E. uncinata* Eto8 株感染個体間の 3 組み合わせの単交配後代について full-sib 交配を行い、その後代種子を実験材料とした。①採種・乾燥処理直後、②40℃の恒温器内で 2 ヶ月間保管、③同 5 ヶ月保管、④40℃・100%RH で 3 日間保管の 4 条件の種子各約 100 粒程度を播種し、検鏡により幼苗における感染の有無を評価した。また、種子の組織切片をアニリンブルー染色し、菌の感染部位を観察した。種子および幼苗由来ゲノム DNA を用い、リアルタイム PCR により *Epichloë* 特異的 18S rRNA 遺伝子のイタリアンライグラス actin 遺伝子に対する相対量を定量した。

4. 研究成果

(1) エンドファイトの種子移行性の遺伝的分離現象の確認を行った。遺伝モデルが正しければ、移行:非移行が 1:1 となる表現型分離が期待されたが、全ての個体が種子移行型であり、またその多くの個体において調査した全ての種子でエンドファイトの感染が確認された。一部の母系は株分け後複数の環境下で調査を行ったが、いずれの環境においても全ての個体が種子移行性を示した。このようにイタリアンライグラス-*Epichloë* 共生系において感染植物体から種子への菌の移行がほぼ完全に行われることが検証された系統はこれまでになく、また害虫防除など実用上必要とされる共生系の安定性確保という観点からすると、この結果は本系統の実用上の有用性を示すものと思われた。しかしながらエンドファイトの種子移行性に植物側の遺伝子型により分離が生じるという前提が再現できなかったため、当初の研究計画を変更し、2) に示す種子から植物体へのエンドファイトの移行に研究対象を変更した。また当初の予定とは別に、後代種子感染率に影響する要因のうち、植物体から後代種子への菌移行過程を調べるため、*E. occultans* 感染 1 系統と *E. uncinata* 感染 2 品種の穂内の感染種子マップを作成した。菌は穂軸中を植物の根元から穂先方向へ、また小穂中を穂軸から先端方向へ伸長し、菌糸分布域内では高率に種子感染が成立していた。このことから種子感染率は菌がどれだけ植物体の先端まで伸長できるかによって決まることが明らかとなった。また菌糸分布域の大きさは菌種および宿主植物によって異なる可能性が示唆された。

(2) エンドファイト感染率低下リスクが生じうるプロセスとしては、植物体から種子への移行の他に、種子保存中の菌の生存維持および発芽時の菌の幼苗への移行がある。これまでの試験結果から、イタリアンライグラス-*E. uncinata* 共生系は、自然界に存在するイタリアンライグラス-*E. occultans* 共生系と比較し、幼苗における感染率が低い可能性が示唆されており、その要因の解明を目的に研究を行なった。植物側の遺伝的背景が揃いつつ種子感染率が 97%以上の 3 組

合せの *E. uncinata* 感染種子 (Eu) および *E. occultans* 感染種子 (Eo) を作出した。採種直後 (①) の幼苗感染率 (=幼苗移行率) は1つの組合せで有意に Eu が低かったものの、残り2組合せは両菌種ともに80%以上で菌種間に有意差はなかった。劣化処理 (②~④) を行った種子では、Eo の幼苗感染率はいずれも80%以上を維持していた。一方、Eu の平均幼苗感染率は②で54.9%、③で35.0%、④で11.6%であり、いずれの組合せにおいても有意に Eo より低かった。これらの幼苗移行率を図1に示す。幼苗において Eo は葉鞘基部1mm以下の限られた部位にのみ菌糸が認められるのに対し、Eu は菌糸が葉鞘上位にまで伸長しており、少なくとも基部から2-3cmの範囲にまで存在することをDNAレベルで確認し両菌の幼苗における組織局在性の差異を明らかにした。種子においては Eu および Eo いずれも菌糸がアリューロン層と種皮の間に局在しており、菌種間で差異は認められなかった (図2)。種子中の菌由来DNA量は Eu が Eo より多い傾向を示した (図3)。以上の結果から、*E. uncinata* は *E. occultans* に比べ、種子中の菌の活性または生存率が高温・高湿条件によって低下し、幼苗への菌移行率が低くなる事が明らかとなった。またその原因は種子における感染量や局在部位以外の要因によることが示唆された。

以上よりイタリアンライグラスにおいて *E. uncinata* は植物体から種子へは安定的に移行しうるものの、種子中での安定性が低く、種子の保管条件によっては次代での大幅な感染率低下につながりうる事が明らかとなった。今後、*E. uncinata* の本来の宿主であるメドウフェスク (*Festuca pratensis* Huds.) 共生系との比較を行うことで、イタリアンライグラスにおける *E. uncinata* の低い安定性が、菌種特性によるものなのか、それとも宿主植物との親和性によるものなのかが明らかになると思われる。得られた *Epichloë* エンドファイト共生系における安定性に関する基礎的知見は、将来的に、安定的なエンドファイト感染品種の開発等に活用されることが期待される。

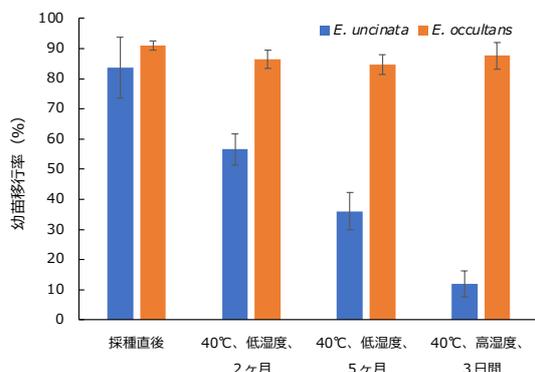


図1 各種子保管条件における幼苗移行率
3集団の平均値および標準偏差を示す。

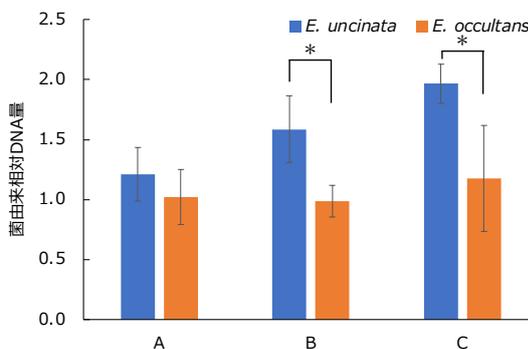


図3 種子中の菌由来相対DNA量の比較

A, B および C 集団における *Epichloë* 18S rRNA 遺伝子のイタリアンライグラス actin 遺伝子に対する相対量。*, $p < 0.05$ 。

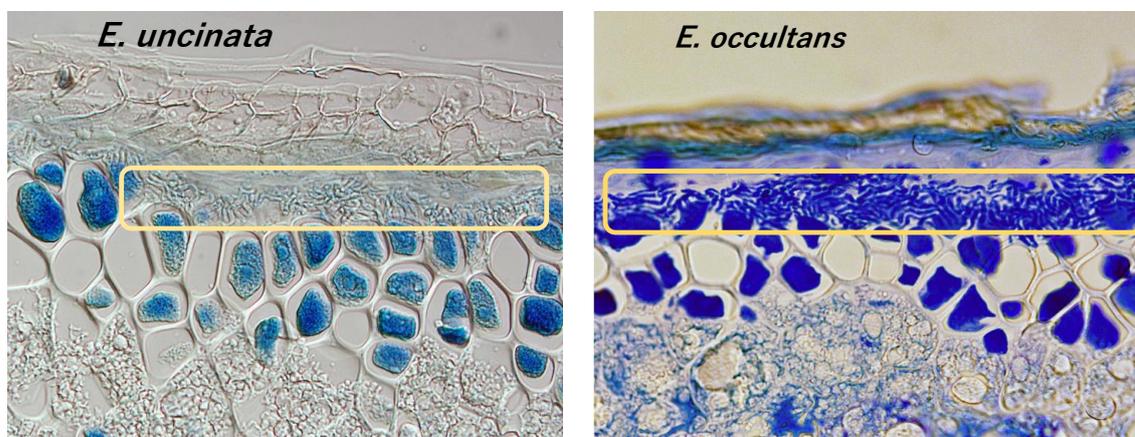


図2 種子中のエンドファイト感染部位の比較

アリューロン層と種皮の間の *Epichloë* エンドファイトの局在部位を囲み線で示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村健一・吉田信代・清多佳子・菅原幸哉
2. 発表標題 イタリアンライグラス - Epichloe属エンドファイト共生系における種子から幼苗への菌移行率の菌種間比較
3. 学会等名 2023年度日本草地学会札幌大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清 多佳子 (Kiyoshi Takako) (40391362)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員 (82111)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉田 信代 (Yoshida Nobuyo) (30202401)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・再雇用職員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------